

Versuche zur Darstellung der  
Peptidsequenz  
„Glycyl-L-seryl-L-leucyl-L-tyrosyl-  
L-glutaminsäure“

von

KARL FISCHER

1960



Versuche zur Darstellung der Peptidsequenz  
"Glycyl-L-seryl-L-leucyl-L-tyrosyl-  
L-glutaminsäure"

- - - - -

Inaugural-Dissertation  
zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der  
Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der  
Ludwig-Maximilian-Universität  
zu München

vorgelegt von  
Karl Fischer  
aus  
München  
Mai 1960



Berichterstatter: 1. Prof.Dr.W.Graßmann

2. Prof.Dr.R.Huisgen

Tag der mündlichen Prüfung: 27.Juli 1960

In Dankbarkeit meinen Eltern gewidmet.



Digitized by the Internet Archive  
in 2026

[https://archive.org/details/IA41554030\\_0028](https://archive.org/details/IA41554030_0028)

Vorliegende Arbeit wurde im  
Max-Planck-Institut  
für Eiweiß- und Lederforschung  
in der Zeit von  
Juni 1957 bis November 1959  
unter der Leitung von  
Herrn Prof.Dr.Wolfgang Graßmann  
ausgeführt.

Meinem verehrten Lehrer,  
Herrn Prof.Dr.Wolfgang Graßmann,  
möchte ich für seine bereitwillige  
Unterstützung meinen ergebensten  
Dank aussprechen.



# INHALTSVERZEICHNIS

## Einleitung

### Theoretischer Teil

|                                                                                    |    |
|------------------------------------------------------------------------------------|----|
| A) Darstellung von Carbobenzoxy-glycyl-O-benzyl-L-serin-hydrazid                   | 8  |
| B) Darstellung von L-Leucyl-L-tyrosyl-L-glutaminsäure                              | 10 |
| C) Darstellung von Glycyl-L-seryl-L-leucyl-L-tyrosyl-L-glutaminsäure               | 14 |
| D) Darstellung von Glycyl-L-seryl-L-leucyl-L-tyrosyl-L-glutaminsäure-dimethylester | 17 |

### Experimenteller Teil

|                                                          |    |
|----------------------------------------------------------|----|
| A) <u>Carbobenzoxy-glycyl-O-benzyl-L-serin-hydrazid</u>  |    |
| 1.) O-Benzyl-L-serin                                     |    |
| a) 1,2-dibrom-propionsäure-äthylester                    | 20 |
| b) O-Benzyl-DL-serin                                     | 20 |
| c) O-Benzyl-N-formyl-DL-serin                            | 21 |
| d) O-Benzyl-N-formyl-L-serin                             | 21 |
| e) O-Benzyl-L-serin                                      | 22 |
| 2.) O-Benzyl-L-serin-methylester-hydrochlorid            | 22 |
| 3.) Carbobenzoxy-glycyl-O-benzyl-L-serin-methylester     | 23 |
| 4.) Carbobenzoxy-glycyl-O-benzyl-L-serin-hydrazid        | 24 |
| B) <u>L-Leucyl-L-tyrosyl-L-glutaminsäure</u>             |    |
| 1.) Carbobenzoxy-L-leucin                                | 24 |
| 2.) O-Benzyl-L-tyrosin                                   | 24 |
| 3.) O-Benzyl-L-tyrosin-methylester                       | 25 |
| 4.) Carbobenzoxy-L-leucyl-O-benzyl-L-tyrosin-methylester | 25 |

|                                                                                                           |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 5.) Carbobenzoxy-L-leucyl-O-benzyl-L-tyrosin-<br>hydrazid                                                 | 26 |
| 6.) L-Glutaminsäure-dibenzylester-hydrochlorid                                                            |    |
| a) nach Sachs und Brand (35)                                                                              | 26 |
| b) nach Miller und Waelsch (36)                                                                           | 27 |
| 7.) Carbobenzoxy-L-leucyl-O-benzyl-L-tyrosyl-<br>L-glutaminsäure-dibenzylester                            | 28 |
| 8.) L-Leucyl-L-tyrosyl-L-glutaminsäure                                                                    | 29 |
| <br>C.) <u>Glycyl-L-seryl-L-leucyl-L-tyrosyl-<br/>L-glutaminsäure</u>                                     | 32 |
| 1.) Carbobenzoxy-glycyl-O-benzyl-L-seryl-L-leucyl-<br>L-tyrosyl-L-glutaminsäure                           | 30 |
| 2.) Glycyl-L-seryl-L-leucyl-L-tyrosyl-<br>L-glutaminsäure                                                 | 32 |
| <br>D.) <u>Carbobenzoxy-glycyl-O-benzyl-L-seryl-L-leucyl-<br/>L-tyrosyl-L-glutaminsäure-dimethylester</u> |    |
| 1.) L-Glutaminsäure-dimethylester-hydrochlorid                                                            | 32 |
| 2.) Carbobenzoxy-L-leucyl-O-benzyl-L-tyrosyl-<br>L-glutaminsäure-dimethylester                            | 33 |
| 3.) L-Leucyl-L-tyrosyl-L-glutaminsäure-di-<br>methylester                                                 | 34 |
| 4.) L-Leucyl-L-tyrosyl-L-glutaminsäure-di-<br>methylester-hydrochlorid                                    | 35 |
| 5.) Carbobenzoxy-glycyl-O-benzyl-L-seryl-L-leucyl-<br>L-tyrosyl-L-glutaminsäure-dimethylester             | 36 |
| 6.) Glycyl-L-seryl-L-leucyl-L-tyrosyl-L-glutamin-<br>säure-dimethylester                                  | 36 |
| <br><u>Zusammenfassung der Ergebnisse</u>                                                                 | 38 |
| <br><u>Literatur-Verzeichnis</u>                                                                          | 40 |

## EINLEITUNG.

Die stürmische Entwicklung der Isolierungs-und Analysemethoden auf dem Naturstoffgebiet in den letzten Jahrzehnten führte zur Aufklärung vieler biochemisch wichtiger Stoffe, von denen die peptidartigen bzw. peptidhaltigen Substanzen einen breiten Raum einnehmen. Vor allem die Entdeckung der Verteilungschromatographie und die Entwicklung der Methoden der multiplikativen Verteilung, der Ionenaustauschchromatographie und der Trägerelektrophorese ermöglichten die Isolierung und die Bausteinanalyse auch von geringen Mengen an peptidartigen Naturstoffen. In der Folge sind bereits eine ganze Reihe natürlich vorkommender Oligo-und Polypeptide mit zum Teil ausserordentlich starken biologischen Wirkungen entdeckt und konstitutionell soweit geklärt worden, dass ihre Aminosäurereihenfolge heute genau angegeben werden kann. Zu diesen Oligo-bzw. Polypeptiden zählen Hormone, Toxine und Antibiotica, die sich durch Spezifität und hohe Wirksamkeit auszeichnen.

Die Aufklärung dieser, für den Lebensprozess so bedeutsamen peptidartigen Wirkstoffe ergab für den präparativen Chemiker die lohnende Aufgabe, solche Naturstoffe aus einfachen Aminosäurebausteinen zu synthetisieren. Als bald stellten sich beachtliche Anfangserfolge ein, die durch die berühmt gewordene Synthese des Hypophysenhinterlappenhormons " O c y t o c i n " - einem cyclischen Nonapeptid - von du Vigneaud (1) eingeleitet wurden. Spätere Synthesen stammen von Boissonnas (2), Rudinger (3) und Veluz (4); ausserdem wurden mehrere Analoge des Ocytocins (5,6,7,8) dargestellt. In der Folgezeit gelang es, noch eine Reihe anderer biochemisch wichtiger Polypeptidwirkstoffe zu synthetisieren, z.B. die Hypertensin-Peptide (9,10,11), Gramicidin S (12), um nur einige zu nennen.

Zu den wesentlichsten Aufgaben der präparativen Forschungsrichtung zählen sowohl die Bestätigung der aus

analytischen Methoden gewonnenen Konstitutionsformel, als auch die Darstellung von grösseren Mengen an Substanz, um ein umfangreicheres Studium der chemischen- und physikalischen Eigenschaften des Stoffes zu gewährleisten. Ausserdem bietet die präparative Chemie die Möglichkeit, durch Darstellung von Derivaten die Spezifität zu lokalisieren und durch Veränderung der Aminosäuresequenz andersartige Wirkungen hervorzurufen. Nach dem bisherigen Stand der Peptidchemie wurden im wesentlichen Peptide synthetisiert, die sich im Bereich der Oligopeptide bewegen. Der Sprung zu den Polypeptiden mit grösserer Kettenlänge blieb bis jetzt noch versagt und bedarf der Entwicklung neuer Verfahren. Von den längerkettigen Verbindungen, wie z.B. Corticotropin (13), Glucagon (14) und dem Insulin (15) wurden Bruchstücke synthetisiert, um an diesen Sequenzen konstitutionelle und funktionelle Fragen zu studieren. So stellten Boissonnas und Mitarbeiter (16) und K. Hofmann mit seinem Arbeitskreis (17) Peptidsequenzen aus dem Corticotropin dar. Merrifield und Woolley (18) synthetisierten ein Pentapeptid aus der B-Kette des Insulins (Position 9-13), das unter dem Namen "Strepogenin" bekannt geworden ist, da es sich durch eine gewisse Wachstumswirkung gegenüber Mikroorganismen auszeichnet.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte das Pentapeptid "Glycyl-L-seryl-L-leucyl-L-tyrosyl-L-glutaminsäure" als Vergleichssubstanz dargestellt werden, das von R. Strobel (19) in einer an unserem Institut durchgeführten Arbeit im Gegensatz zur Sanger'schen Formel für die ersten 5 Positionen der A-Kette des Insulins postuliert worden war. Die Strobel'schen Befunde<sup>x</sup> unterscheiden sich von der Sanger'schen Sequenz in

<sup>x</sup>E. Granzer (20) sowie K. Hannig und M. Schleyer (21) konnten anschliessend durch Arbeiten an unserem Institut die Sanger'sche Insulinformel (15) bestätigen. Eine eingehende Diskussion der Strobel'schen Ergebnisse findet sich in der Dissertation von E. Granzer (20).

den Positionen 2, 3 und 4.

| Aminosäurepositionen | 1 | 2   | 3    | 4   | 5                           |
|----------------------|---|-----|------|-----|-----------------------------|
| Strobel'sche Formel  |   | Gly | Ser  | Ieu | Tyr-Glu.....                |
| Sanger'sche Formel   |   | Gly | Ileu | Val | Glu-Glu-NH <sub>2</sub> ... |

Dabei ist noch zu erwähnen, dass sich die von Strobel gefundenen Aminosäuren in der Sanger'schen Formel vom Serin an gerechnet in den Positionen 12 mit 15 befinden.

| Aminosäurepositionen | 10  | 11  | 12  | 13  | 14  | 15          |
|----------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-------------|
|                      |     |     | --S |     |     |             |
| Sanger'sche Formel   | --- | Val | Cys | Ser | Ieu | Tyr-Glu---- |

Eine in Position 12 (Serin) angenommene Acylwanderung, wie sie E.Granzer (20) in seiner in unserem Hause durchgeführten Dissertation diskutiert, könnte die Ergebnisse von F.Sanger und R.Strobel koordinieren.

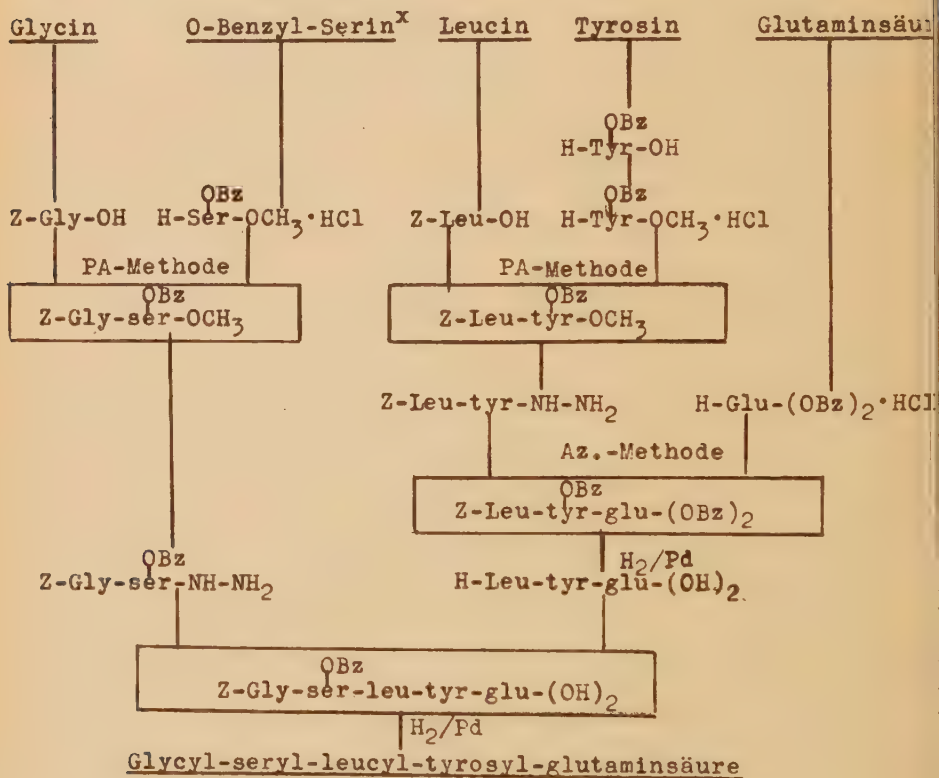
Wegen der Anhäufung von drei trifunktionellen Aminosäuren (Serin, Tyrosin, Glutaminsäure) ist die Darstellung dieses Pentapeptids auch von peptidchemischem Interesse. Die präparative Handhabung von Serin und Tyrosin wurde durch die in unserem Institut ausgearbeiteten Darstellungsvorschriften (22,23) der Benzyläther dieser beiden Aminosäuren erleichtert und die Synthese einwandfreier Peptide z.B. nach der Phosphorazomethode gesichert. Der Benzylrest als Schutzgruppe lässt sich ausserdem sehr elegant hydrogenolytisch mit Pd-Schwarz abspalten.

Es schien mir zweckmässig, das zum Thema gestellte Pentapeptid - "Glycyl-L-seryl-L-leucyl-L-tyrosyl-L-glutaminsäure" - aus einem Di- und Tripeptid gemäss den Formelschemen I und II darzustellen. Die in Formelschema I und II aufgezeigten Reaktionswege unterscheiden sich im Aufbau des Tripeptids. In I wurde dafür der Glutaminsäuredibenzylester und in II der Glutaminsäure-dimethylester

# Synthese von

## Glycyl-L-seryl-L-leucyl-L-tyrosyl-L-glutaminsäure.

### SCHEMA I



|             |   |                    |
|-------------|---|--------------------|
| PA-Methode  | = | Phosphorazomethode |
| Az.-Methode | = | Azidmethode        |
| Z           | = | Carbobenzoxygruppe |
| Bz          | = | Benzylrest         |

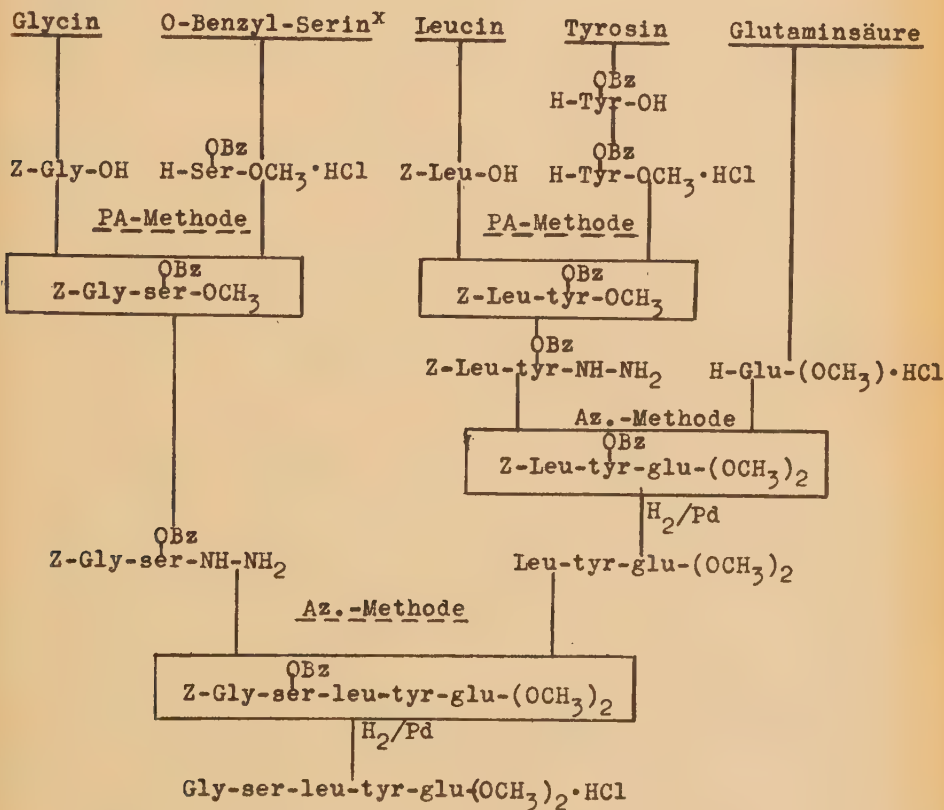
x) O-Benzyl-Serin wurde vollsynthetisch aus Acrylsäure - ester und nachfolgender Racematspaltung (22) dargestellt.

Synthese von

Glycyl-L-seryl-L-leucyl-L-tyrosyl-L-glutaminsäure-

dimethylester-hydrochlorid.

SCHEMA II



PA-Methode = Phosphorazomethode

Az.-Methode = Azidmethode

Z = Carbobenzoxygruppe

Bz = Benzylgruppe

<sup>x</sup>) siehe Seite 4

verwendet. Die nachfolgende hydrogenolytische Abspaltung der Schutzgruppen erbrachte in I das freie Tripeptid und in II dessen Dimethylester. Der weitere Umsatz zum Pentapeptidderivat nach der Azidmethode gelang beim Tripeptid-dimethylester im organischen Lösungsmittel, dagegen konnte die Synthese mit dem Salz des freien Peptids nur im wässerigen Medium (Äther/Wasser oder Dioxan/Wasser) ausgeführt werden. Der Weg nach Schema I führte über das Carbobenzoxy-pentapeptid zum freien Peptid. Der Weg nach Schema II lieferte zwar den kristallinen Carbobenzoxy-pentapeptid-dimethylester, aber die hydrogenolytische Abspaltung des Carbobenzoxy- und des Benzylrestes ergab kein einheitliches Produkt.

Die als Zwischensubstanzen notwendigen Dipeptidderivate Carbobenzoxy-glycyl-O-benzyl-serin-methylester und Carbobenzoxy-L-leucyl-O-benzyl-tyrosin-methylester wurden nach der Goldschmidt'schen Phosphorazomethode (24) aufgebaut. Die fast immer ausgezeichneten Ausbeuten dieser an unserem Institut sehr häufig zur Synthese von Dipeptiden angewandten Methode (25) gaben ihr unter den gebräuchlichen Peptidknüpfungsmethoden den Vorzug. Carbobenzoxy-L-leucyl-O-benzyl-L-tyrosin-methylester war bereits von Wünsch und Mitarbeitern (26) nach dieser Phosphorazomethode mit sehr guter Ausbeute dargestellt worden. Für die Synthese höherer optisch-aktiver Peptide ist jedoch die Phosphorazomethode nur in Sonderfällen verwendbar. Nach W.Grassmann, E.Wünsch und F.Riedl (27) tritt nämlich bei der Synthese höherer Peptide nach diesem Verfahren aus Carbobenzoxy-peptiden mit carboxyl-endständiger, optisch aktiver Aminosäure mehr oder weniger Racemisierung ein.

Für die Darstellung von Tripeptid- und Pentapeptid-derivaten kommen vor allem das für den Aufbau höherer Peptide heute sehr gebräuchliche Sheehan'sche Carbodiimid-verfahren (28), sowie die Curtius'sche Azidmethode (29) in Betracht. Der Nachteil des Dicyclohexyl-carbodiimid-verfahrens besteht darin, dass sich der als Nebenprodukt anfall-

lende N,N'-Dicyclohexyl-harnstoff oft schwer vom gewünschten Reaktionsprodukt trennen lässt.

Ich entschied mich daher für die schon lange Zeit bekannte, aber immer noch zu den wichtigsten Verfahrensweisen zählende Curtius'sche Azidmethode. Mit ihrer Hilfe ist es möglich, Aminodicarbonsäuren (30) und Oxyaminosäuren (31) in einzelnen Fällen auch ohne Verwendung besonderer Schutzgruppen umzusetzen. Eine Racemisierung, selbst in geringem Masse, wurde bisher nicht beobachtet (32). Bereits 1904 synthetisierten Curtius und Mitarbeiter Glycin- und Alaninpeptide (33), indem sie die entsprechenden Azide mit den Natriumsalzen von Glycin bzw. Alanin oder deren Peptide im wässrigen Medium umsetzten. Neuerdings wandten K. Hofmann und Mitarbeiter (17) diese Methode zur Darstellung einiger Peptidsequenzen aus dem Corticotropin an. In vorliegender Arbeit wurde dieses modifizierte Azidverfahren zur Darstellung des Carbobenzoxypentapeptidderivates angewandt.

Als Aminoschutzgruppe wurde ausschliesslich der von Bergmann und Zervas (34) eingeführte Carbobenzoxystoff verwendet. Zur Blockierung der Carboxylgruppe der jeweiligen Endkomponente wurde die carboxylendständige Aminosäure in den Benzylester (Schema I) oder Methylester (Schema II) übergeführt. In Verbindung mit dem als Aminoschutzgruppe eingeführten Carbobenzoxystoff bietet der Benzylester den Vorteil, dass der Carbobenzoxypeptid-dibenzylester in einem Arbeitsgang mit Hilfe der katalytischen Hydrierung sehr schonend in das freie Peptid übergeführt werden kann.

THEORETISCHER TEIL.

A) Darstellung von Carbobenzoxy-glycyl-O-benzyl-  
L-serin-hydrazid:

O-Benzyl-DL-serin wurde nach W.Grassmann, E.Wünsch, P.Deufel, A.Zwick (22) und in Anlehnung an die von du Vigneaud und Mitarbeitern (22) für DL-Serin gegebene Vorschrift vollsynthetisch dargestellt. Anschliessend wurde O-Benzyl-DL-serin nach einer Arbeit von E.Wünsch und G.Fürst (22) über die Formylverbindung mit Brucin und Chinin in die optisch-aktiven Komponenten zerlegt.

Die leichte Abspaltbarkeit der Formylgruppe im sauren Medium veranlasste mich, gleich das O-Benzyl-N-Formyl-L-serin in 1n methanolischer HCl zu verestern. Nach dreimaligem Verestern erhielt ich in sehr guter Ausbeute chromatographisch reines O-Benzyl-L-serin-methylester-hydrochlorid (Bild 1), das beim Umkristallisieren in Methanol/Ather lange Nadeln bildete. Der so gewonnene Ester wurde mit Carbobenzoxy-glycin nach der Phosphorazomethode in 90%iger Ausbeute zum Dipeptidderivat umgesetzt.

Die Weiterverarbeitung zum Hydrazid erfolgte in Methanol mit der äquivalenten Menge an Hydrazinhydrat bei Zimmertemperatur. Die erhaltene gelatinöse Masse liess sich nach Aufnahme in heissem Methanol zur Kristallisation bringen.

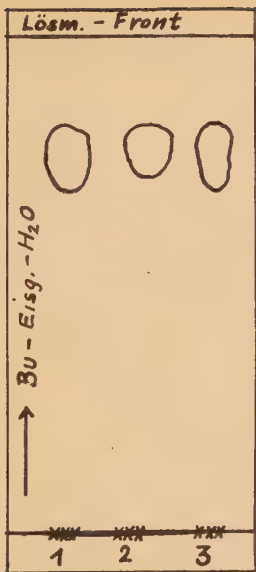


Bild 1.

Chromatogramm von  
OBz-L-Ser-OCH<sub>3</sub>·HCl

Lösungsmittel:

n-Bu - Eisg. - Wasser

4 : 1 : 5

Anfärbung: Ninhydrin  
aufstg. SS 2043b

1,2,3 stellen verschiedene  
Fraktionen des Esters dar.

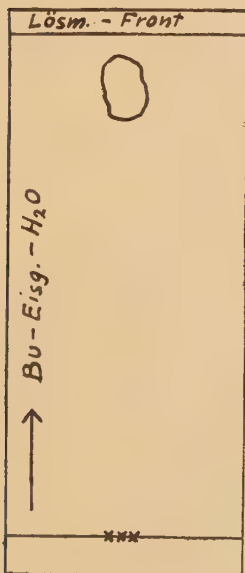


Bild 2.

Chromatogramm von  
L-Glu-(OBz)<sub>2</sub>·HCl

Lösungsmittel:

n-Bu - Eisg. - Wasser

4 : 1 : 5

Anfärbung: Ninhydrin  
aufstg. SS 2043 b

B) Darstellung von L-Leucyl-L-tyrosyl-L-glutaminsäure.  
(Schema I)

Carbobenzoxyl-L-leucyl-L-O-benzyl-L-tyrosin-methylester wurde nach einer an unserem Institut ausgearbeiteten Vorschrift (23) nach der Phosphorazomethode dargestellt. Die Überführung in das Hydrazid gelang durch Erwärmen der alkoholischen Lösung auf dem Wasserbad mit einem geringen Überschuss an Hydrazinhydrat. Das Hydrazid kristallisierte beim Abkühlen in langen Nadeln aus. L-Glutaminsäure-di-benzylester-hydrochlorid wurde nach zwei Methoden dargestellt. Eine Veresterung mit Benzylalkohol/HCl nach Sachs und Brand (35) ergab ein unreines Produkt; dagegen führte die Darstellung nach K. Miller und H. Waelisch (36), wobei als Katalysator Benzolsulfosäure verwendet, der freie Ester isoliert und in das Hydrochlorid dann übergeführt wird, mit guter Ausbeute zu einem chromatographisch reinen Produkt. (Bild 2)

Bei der nachfolgenden Synthese zum Carbobenzoxyl-L-leucyl-O-benzyl-L-tyrosyl-L-glutaminsäure-di-benzylester stellten sich Schwierigkeiten ein. Wegen der Schwerlöslichkeit des Hydrazids in dem zur Überführung in das Azid gebräuchliche Lösungsmittelgemisch (Essigsäure:Wasser:Salzsäure) wurde die Konzentration der Essigsäure stark erhöht, um das Hydrazid in Lösung zu halten. Die Isolierung des darauffolgend gebildeten Azids erschwerte sich dadurch erheblich. Die Extraktion des Azids gelang schliesslich nach starker Verdünnung mit Wasser; das übliche Säurefreiwaschen der Ätherlösung war jedoch erst nach oftmaligem Ausschütteln mit  $\text{KHCO}_3$ -Lösung zu erzielen. Trotz Kühlhaltung der Lösungen ( $0^\circ\text{C}$ ) liess sich eine Zersetzung des gebildeten Azids, die sich durch Flockenbildung bemerkbar machte, nicht vermeiden.

Die nachfolgende Umsetzung zum Carbobenzoxy-tripeptid-dibenzylester erbrachte zwar ein reines Produkt, aber nur eine Ausbeute von 23% der Theorie.

Um die Zersetzung des Azids, die beim Auswaschen der Ätherphase auftritt, zurückzudrängen, wurde in einem neuen Versuch nach der Azidbildung zu dem oben angeführten Lösungsmittelgemisch vor der Extraktion mit Äther sehr viel Wasser zugesetzt. Auf diese Weise gelang es mir, die Ausbeute an Tripeptidderivat auf 55% d.Th. zu erhöhen.

Die Beobachtung, dass das bei der Umsetzung mit  $\text{HNO}_2$  zunächst ölig ausfallende Azid beim Stehen zur Kristallisation neigte, bewog mich, in einem weiteren Ansatz die völlige Kristallisation abzuwarten. Das abgenutzte und rasch mit Eiswasser gewaschene kristalline Azid wurde in Essigester aufgenommen und die Lösung sofort zur Umsetzung verwandt. Unter diesen Verfahrensbedingungen stieg die Ausbeute an isoliertem Carbobenzoxy-tripeptid-dibenzylester auf 71% d.Th.

Durch die Verwendung des Carbobenzoxy- und des Benzylrestes als Schutzgruppen war es möglich, in einem Reaktionsschritt zum freien Tripeptid zu gelangen. Die hydrogenolytische Abspaltung erfolgte in Dioxan/Wasser unter Zusatz von Eisessig mit Pd-Schwarz. Nach 10 Stunden wurde der Katalysator erneuert (das für den Aufbau des Tripeptids verwendete L-Leucin enthält geringe Mengen an Methionin, die in Spuren in die Synthese eingeschleppt werden und dadurch den Katalysator nach einiger Zeit unbrauchbar machen) und die Hydrierung weitere 11 Stunden fortgesetzt. Ein chromatographischer Test zeigte nach 20 Stunden noch eine geringe Menge an nicht abhydrierter Substanz, die sich nach einer weiteren Stunde vernachlässigen liess.

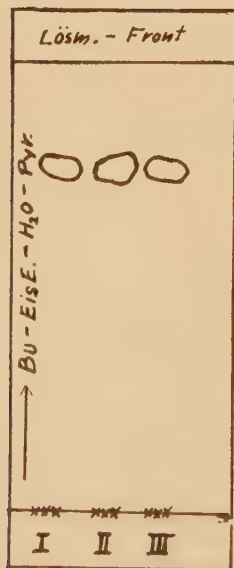
Das nach der üblichen Aufarbeitung erhaltene, schwach gelb gefärbte Rohprodukt liess sich aus heissem Wasser unter erheblichen Verlusten umkristallisieren. Es erwies sich als zweckmässiger, das freie Tripeptid in

wässrigem Methanol aufzunehmen und die Kristallisation durch vorsichtigen Zusatz von Äther auszulösen. Die chromatographischen Tests in zwei verschiedenen Lösungsmittelsystemen und im zweidimensionalen Verfahren zeigten die Reinheit der Verbindung an. (Bilder 3,4,5)

Chromatogramme des freien Tripeptids:

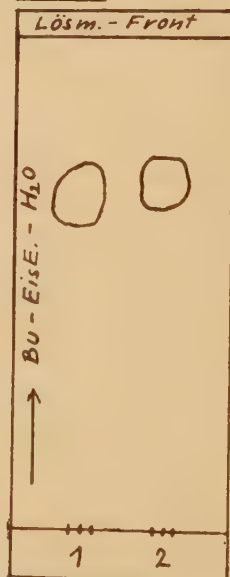
L-Leucyl-L-tyrosyl-L-glutaminsäure

Bild 3



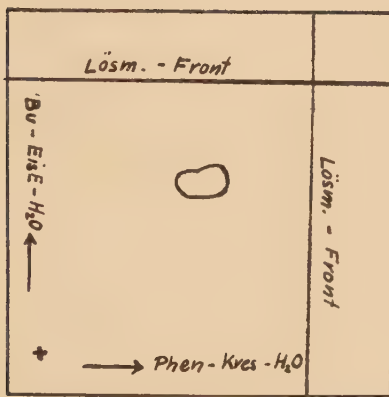
n-Bu - Eisg. - Wasser - Pyr:  
 50 : 6 : 24 : 20  
 Anfärbung: Ninhydrin  
 aufstg. SS 2043 b  
 I, II sind aus H<sub>2</sub>O umkristallisierte Fraktionen.  
 III ist aus Wasser/Meth./Äther umkristallisiertes Produkt.

Bild 4



n-Bu - Eisg. - Wasser  
 4 : 1 : 5  
 Anfärbg.: Reindl-Hoppe  
 aufstg. SS 2043 b  
 1 ist aus Wasser und  
 2 aus H<sub>2</sub>O/Meth./Äther umkristallisiertes Produkt.

Bild 5



Zweidimensionales Chromatogramm

Vertikal :

n-Butanol - Eisessig - Wasser

4 : 1 : 5

Horizontal:

Phenol - Kresol - Wasser

1 : 1 : 2

Anfärbung: Ninhydrin

aufstg. Binzer 208

C) Darstellung von Glycyl-I-seryl-I-leucyl-I-tyrosyl-  
L-glutaminsäure (nach Schema I).

Der Aufbau dieses Pentapeptids erfolgte nach der von K. Hofmann und Mitarbeitern (17) modifizierten Curtius'schen Azidmethode. Das freie Tripeptid (I-Leucyl-I-tyrosyl-I-glutaminsäure) wurde als Triäthylammoniumsalz in Wasser gelöst und mit der ätherischen Lösung des Dipeptid-azids (Carbobenzoxy-glycyl-O-benzyl-I-serin-azids) in mehrfachem Überschuss umgesetzt. Die Reaktionsmischung (Zweiphasensystem) wurde 40 Stunden bei 5°C geschüttelt und nach Abtrennung der ätherischen Phase die wässrige Schicht in der üblichen Weise aufgearbeitet. Ich erhielt so ein weisses, amorphes Produkt, das sich nicht zur Kristallisation bringen liess. Die Elementaranalyse, sowie die quantitative Aminosäurebestimmung ergaben keine befriedigenden Werte.

In einem zweiten Versuchsansatz wurde das Tripeptid in wenig Wasser + 2 Äquivalenten Triäthylamin gelöst, die erhaltene Lösung mit der 10-fachen Menge Dioxan verdünnt, mit einer Lösung von Carbobenzoxy-glycyl-O-benzyl-serin-azid in Dioxan vereinigt und 40 Stunden bei 5°C belassen. Nach Abdampfen des Dioxans mit der bereits angeführten Aufarbeitung resultierte ein Produkt, das aus Methanol/Äther mit Petroläther in analysenreiner, aber nicht kristallisierbarer Form ausgefällt werden konnte. (Ausbeute 27,5% d.Th.) Die Abspaltung des Carbobenzoxy- und des Benzylrestes wurde hydrogenolytisch mit Pd/H<sub>2</sub> in wässrigem Dioxan unter Zusatz von Essigsäure vorgenommen. Nach zehnstündiger Hydrierung wurde vom Katalysator abfiltriert und die Lösung im Vakuum eingedampft. Der amorphe Rückstand konnte nicht zur Kristallisation gebracht werden. Das Rohprodukt erwies sich als chromatographisch nicht einheitlich (Bild 6). Nach mehrmaligem Digerieren mit warmem Wasser konnte das Pentapeptid als unlöslicher Rückstand in chromatographisch reiner Form erhalten werden. (Ausbeute 21% d.Th.; Bild 7,8.)

Im Hydrolysat des Peptids ließen sich die Aminosäuren Leu, Tyr, Glu, Gly-Ser (1 Fleck) nachweisen.

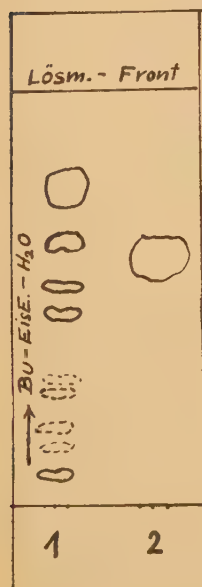
Eine quantitative Aminosäure-Analyse zeigte folgendes Ergebnis (Einwage 1,165 = 2,15 Mikromole) :

|                         | Gly  | Ser  | Leu  | Tyr  | Glu  |
|-------------------------|------|------|------|------|------|
| Gefundene Mikromole :   | 2,20 | 2,09 | 2,07 | 1,61 | 2,15 |
| Gefundenes Verhältnis : | 1,03 | 0,99 | 0,98 | 0,76 | 1,01 |
| Theor. Verhältnis :     | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 1,00 |

Bild 6 bis 9 Chromatogramme des freien Pentapeptids:

"Glycyl-L-seryl-L-leucyl-L-tyrosyl-L-glutaminsäure"

Bild 6



- 1) Rohprodukt des Pentapeptids
  - 2) L-Leucyl-L-tyrosyl-L-glutaminsäure als Vergleichssubstanz
- Lösungsmittelsystem:  
n-Butanol - Eisessig - Wasser  
4 : 1 : 5
- Anfärbung: Ninhydrin  
aufsteigend SS 2043 b

Bild 7

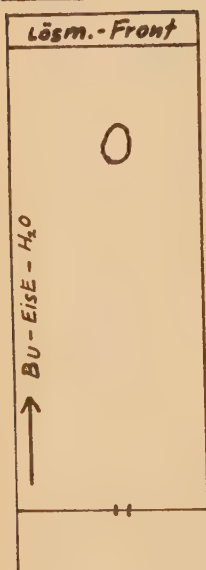


Bild 8

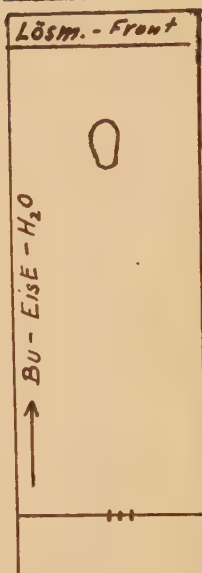
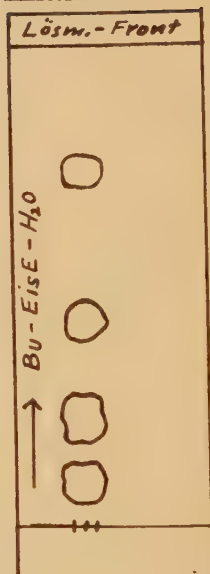


Bild 9



Zu Bild 7 und 8 :

Gereinigtes Pentapeptid

Lösungsmittelsystem:

n-Butanol - Eisessig - Wasser

4 : 1 : 5

Anfärbung:

in Bild 7 mit Ninhydrin

in Bild 8 nach Reindl-Hoppe

aufstg.: SS 2043 b

Zu Bild 9 :

Das Pentapeptid wurde mit

5n HCl 20 Stunden lang bei

110°C hydrolisiert.

Lösungsmittelsystem:

n-Butanol - Eisessig - Wasser

4 : 1 : 5

Anfärbung: Ninhydrin

aufstg. SS 2043 b

D) Darstellung von Glycyl-L-seryl-L-leucyl-L-tyrosyl-L-glutaminsäure-dimethylester.

Das Ziel dieses neuen Versuchsansatzes war es, die Synthese zum Pentapeptid-derivat im wasserfreien Medium auszuführen. Anstelle des in organischen Lösungsmitteln unlöslichen Triäthylammoniumsalzes der L-Leucyl-L-tyrosyl-L-glutaminsäure wurde der Tripeptid-dimethylester in Erwägung gezogen. (Siehe Schema II.) Die Notwendigkeit der Verwendung des Tripeptid-dimethylesters ergab sich aus dem Fehlen einer brauchbaren Methode für die selektive Abspaltung des Carbobenzoxy-restes aus dem im ersten Syntheseweg (siehe Schema I) verwendeten Carbobenzoxy-L-leucyl-O-benzyl-L-tyrosyl-L-glutaminsäure-dibenzylester.

Bei dieser Gelegenheit gelang es mir, das Glutaminsäure-dimethylester-hydrochlorid, das in der mir zugänglichen Literatur nirgends beschrieben war, in kristalliner, chromatographisch- und in analysenreiner Form darzustellen (Bild 10).

Bei der Synthese des L-Leucyl-L-tyrosyl-L-glutaminsäure-dimethylesters wurde zunächst Carbobenzoxy-L-leucyl-O-benzyl-L-tyrosin-azid (siehe oben unter B) mit Glutaminsäure-dimethylester (dargestellt aus L-Glutaminsäure-dimethyl-ester-hydrochlorid und 1 Äquivalent Triäthylamin in Chloroform) zum Carbobenzoxy-tripeptidester in 76%iger Ausbeute umgesetzt.

Die Entfernung der Amino- und phenolischen Hydroxyl-Schutzgruppen gelang mit katalytisch erregtem Wasserstoff (Pd-Schwarz) in methanolischer Lösung in Gegenwart von Essigsäure. Das erhaltene Öl kristallisierte nach Aufnehmen in heissen Essigester und erwies sich als chromatographisch und analytisch reiner Tripeptid-dimethylester. Zur weiteren Charakterisierung wurde ein kleiner Teil in das Hydrochlorid übergeführt (Bild 11 und 12). Der erhaltene

Tripeptid-dimethylester wurde zur weiteren Umsetzung in Chloroform gelöst und mit einer Chloroformlösung von Carbobenzoxo-glycyl-O-benzyl-serinazid versetzt. Die für Carbobenzoxo-ester übliche Aufarbeitung - Extraktion aller basischen Nebenprodukte mittels  $\text{KHCO}_3$ -Lösung und verdünnter  $\text{HCl}$  - lieferte schliesslich den gewünschten Carbobenzoxo-glycyl-O-benzyl-L-seryl-L-leucyl-L-tyrosyl-L-glutaminsäure-dimethylester aus heissem Methanol in kristalliner und analysenreiner Form.

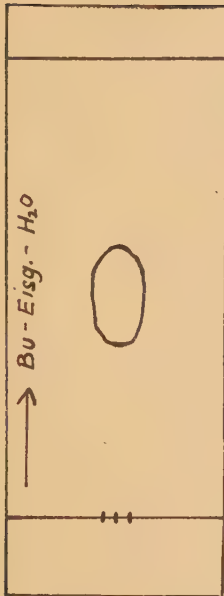
Eine quantitative Aminosäure-Analyse zeigte folgendes Ergebnis (Einwage 0,982mg = 1,185 Mikromole) :

|                       | Gly    | Ser   | Leu   | Tyr                | Glu   |
|-----------------------|--------|-------|-------|--------------------|-------|
| Gefundene Mikromole:  | 1,145  | 1,041 | 1,127 | 0,804 <sup>x</sup> | 1,178 |
| Gefundenes Verhältn.: | 1,00   | 0,91  | 0,99  | 0,70               | 1,03  |
| Theor.Verhältn.       | : 1,00 | 1,00  | 1,00  | 1,00               | 1,00  |

Der Versuch einer Weiterverarbeitung zum freien Penta-peptid-dimethylester durch hydrogenolytische Abspaltung der Schutzgruppen mit Pd-Schwarz erbrachte eine chromatographisch nicht einheitliche, ölige Substanz, die trotz mehrerer Versuche nicht zum Kristallisieren gebracht werden konnte.

<sup>x)</sup> Der zu niedrige Wert des Tyrosins und des Serins entspricht der Erfahrung, dass bei der Säurehydrolyse immer ein Teil beider Aminosäuren zerstört wird.

Bild 10



Zu Bild 10:

L-Glutaminsäure-dimethylester-hydrochlorid  
über den freien Ester gereinigt.

Lösungsmittelsystem:

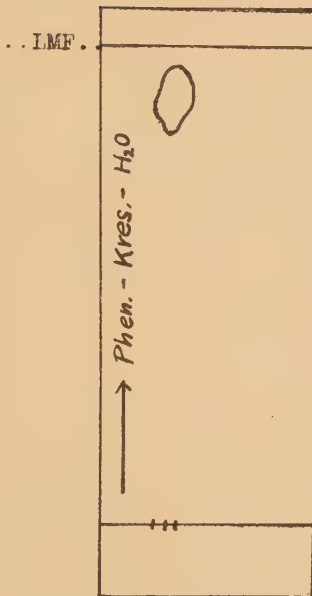
n-Butanol-Eisessig-Wasser

4 : 1 : 5

Anfärbung: Ninhydrin

aufstg. SS 2043b

Bild 11



Zu Bild 11:

L-Leucyl-L-tyrosyl-L-glutaminsäure-  
dimethylester.

Lösungsmittelsystem:

Phenol-Kresol-Wasser

1 : 1 : 2

Anfärbung: Ninhydrin

Zu Bild 12:

L-Leucyl-L-tyrosyl-L-glutaminsäure-  
dimethylester-hydrochlorid.

Lösungsmittelsystem:

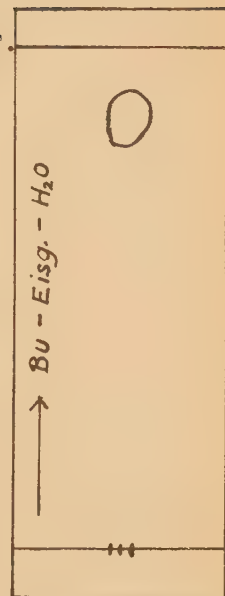
n-Butanol-Eisessig-Wasser

4 : 1 : 5

Anfärbung: Ninhydrin

aufstg. SS 2043b

Bild 12



## EXPERIMENTELLER TEIL.

### 1.) O-Benzyl-L-serin.

#### a) 1,2-Dibrom-propionsäure-äthylester. (38)

1011,2g (10 Mol) Acrylsäure-äthylester wurden mit 1598,3g (10 Mol) Brom umgesetzt. Das Rohprodukt wurde zweimal im Vakuum rektifiziert.

Ausbeute: 2460g 94,4% d.Th.  
Kp. : 214°C 95°C/13mm)

#### b) O-Benzyl-DL-serin. (22)

1160g (4,46 Mol) 1,2-Dibrompropionsäure-ester wurden unter kräftigem Rühren und guter Kühlung (0°C) innerhalb 2 Stunden mit Natriumbenzylat - hergestellt aus 102,6g Natrium und 1200ml Benzylalkohol - versetzt und anschliessend noch eine Stunde weiter gerührt. Danach wurde bei 0°C durch Zutropfen von 980ml 5 n NaOH der Ester verseift. Die mit der äquivalenten Menge 5n H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> neutralisierte Lösung wurde vom abgeschiedenen Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> - NaBr abfiltriert und mehrere Male mit Äther ausgezogen (ungefähr 8 Liter Äther). Die vereinigten ätherischen Phasen wurden mit Wasser gewaschen und über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet. Nach dem Abfiltrieren des Trockenmittels wurde obige Lösung eingedampft, zuletzt bei ca. 70°C. 1-Brom-2-O-benzyl-propionsäure blieb als Öl zurück. Diese wurde auf zwei braune 5-Literflaschen verteilt und in gesättigter wässriger Ammoniaklösung gelöst. Zum Aufrechterhalten der Ammoniakkonzentration wurde täglich neues Ammoniak eingeleitet.

Nach 8 Tagen wurde die klare, etwas gelbliche Lösung in einer grossen Abdampfschale auf die Hälfte ihres Volumens eingengt. Beim Erkalten fiel der grösste Teil des entstandenen O-benzyl-DL-serins in perlmutterartig glänzenden Kristallplättchen aus. Es wurde abgesaugt, mit absolutem Alkohol nachgewaschen und die Restlösung zur Trockene gedampft. Der Kristallkuchen wurde zerkleinert und durch mehrmaliges Waschen mit Alkohol vom beigemeinigten Ammoniumbromid befreit.

Die vereinigten Produkte wurden aus Wasser umkristallisiert.

Ausbeute: 534g 62,4 % d.Th. (Lit. 55-60 %)  
Fp.: 219°C (Lit. 218-219°C)

c) O-Benzyl-N-formyl-DL-serin. (22)

520g (2,68 Mol) O-Benzyl-DL-serin wurden in 2,12 Liter Ameisensäure gelöst. Daraufhin wurden unter Eiskühlung und kräftigem Schütteln 440ml frisch destilliertes Essigsäureanhydrid zugetropft. Das Reaktionsgemisch blieb eine halbe Stunde im Eiswasser und dann 4 Stunden bei Zimmertemperatur stehen. Nach dieser Zeit hörte die CO<sub>2</sub>-Entwicklung auf und der grösste Teil des gewünschten Reaktionsproduktes war zu diesem Zeitpunkt ausgefallen. Es wurde abgenutscht und i.V. über KOH getrocknet. Eine weitere Menge konnte nach Einengen der Mutterlauge auf ein Drittel ihres ursprünglichen Volumens erhalten werden.

Ausbeute: 550g                      92,4% d.Th. ( Lit.92 %)   
 Fp.: 155-160°C                      (Lit. 155-160°)

d) O-Benzyl-N-formyl-L-serin. (22)

446,6g (2Mol) O-Benzyl-N-formyl-DL-serin wurden in 6 Liter heissem Alkohol gelöst und 789g ( 2 Mol) wasserfreies Brucin zugesetzt. Beim langsamen Abkühlen der alkoholischen Lösung kristallisierte das schwerer lösliche Brucinsalz des O-Benzyl-N-formyl-D-serins aus. Das Salz wurde abgenutscht und mit etwas kaltem Alkohol gewaschen. Die Mutterlauge, die den überwiegenden Teil des in Alkohol leichter löslichen Salzes des L-Serinderivates enthält, wurde bei 40°C i.V. bis zur Trockene gedampft. Der Rückstand wurde in 1200ml Chloroform gelöst und mit 500ml 2n NaOH in die Komponenten zerlegt. Die wässrige Lösung wurde abgetrennt und unter Eiskühlung mit 500ml 2n HCl angesäuert. Das Serinderivat fiel sofort dick aus. Nach einigem Stehen im Eisschrank wurde es abgenutscht, abgepresst, in Äther suspendiert und wiederum abgesaugt. Das Produkt wurde über P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> und KOH i.V. getrocknet.

Die Ausbeute betrug 215g. Zur weiteren Reinigung wurde dieses Produkt in 3 Liter heissem absolutem Alkohol gelöst und dann mit 312,5g Chinin gefällt. Das Rohprodukt wurde zweimal aus Alkohol umkristallisiert.

Ausbeute: 445g                      Aus der Mutterlauge 74g

Das Chininsalz wurde in der für das Brucinsalz oben angeführten Weise zerlegt.

Ausbeute: 174,1g                      96,1% d.Th. (Lit.97%)

Das Produkt wurde noch zweimal der Chininfällung unterworfen und folgender Drehwert erhalten:

$$[\alpha]_D^{20} = + 49,7 \pm 0,4 \quad (c = 2,5 \quad 80\% \text{ Alkohol})$$

$$\text{Lit.} [\alpha]_D^{20} = + 51,2 \pm 0,2 \quad (c = 2,5 \quad 80\% \text{ Alkohol})$$

e) O-Benzyl-L-serin. (22)

44,6g (0,2 Mol) O-Benzyl-N-formyl-L-serin wurden in 220ml 1n HBr auf dem Wasserbad erhitzt. Nach einiger Zeit entstand eine klare Lösung, die auf 0°C abgekühlt wurde. Beim Neutralisieren mit Ammoniak fiel der Serinäther aus; die Fällung wurde durch Einengen der Lösung i.V. vervollständigt.

Ausbeute: 35,4g                      91,0% d.Th. (Lit. 91,2%)  
Fp.: 212°C                              (Lit. 212-213°C)

$$[\alpha]_D^{20} = + 22,1 \quad (c = 3; 80\% \text{ Essigs.} + 1 \text{ Äquiv.HCl})$$

2.) O-Benzyl-L-serin-methylester-hydrochlorid.

a) 19,5 (0,1 Mol) O-Benzyl-L-serin wurde mit 200ml 1n methanolischer HCl bei Zimmertemperatur stehen gelassen, i.V. bei Zugabe von Benzol zur Trockene eingedampft. Diese Veresterung wurde noch zweimal wiederholt. Der Eindampfungsrückstand wurde ausserdem noch mit absolutem Methanol versetzt und i.V. zur Trockene eingedampft.

Aus Methanol/Äther umkristallisiert wurden Nadeln erhalten. Der Ester erwies sich als chromatographisch rein.

Ausbeute: 23,7g                      96,5% d.Th.  
Fp.: 163°C

$$[\alpha]_D^{20} = + 4,7 \pm 0,2 \quad (c = 2,0 \text{ Methanol})$$

b.) 22,4g (0,1 Mol) O-Benzyl-N-formyl-L-serin wurden wie unter a) beschrieben verestert. Hierbei wurde der Formylrest durch Methanolyse abgespalten.

Ausbeute: 22,4g 91,2 % d.Th.  
Fp.: 162°C

### 3.) Carbobenzoxy-glycyl-O-benzyl-L-serin-methylester.

12,29g (0,05 Mol) O-Benzyl-L-serin-methylester-hydrochlorid werden in 50ml wasserfreiem Pyridin gelöst und auf -5°C abgekühlt. Dazu fügt man unter Schütteln eine gekühlte Lösung von 2,16ml (0,025 Mol)  $\text{PCl}_3$  in Pyridin tropfenweise zu. Nach einigen Minuten gibt man 10,41g (0,05 Mol) Carbobenzoxy-glycin gelöst in Pyridin zu und erwärmt die Reaktionsmischung drei Stunden auf dem Wasserbad, kühlt ab und dampft im Vakuum ein.

Der Rückstand wird zwischen Essigester und Wasser verteilt, die abgetrennte Essigesterphase mit verdünnter  $\text{HCl}$ , Wasser,  $\text{KHCO}_3$ -Lösung und wieder mit Wasser gewaschen. Die über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknete Lösung wird i.V. zur Trockene eingedampft.

Der Rückstand wird aus Essigester/Petroläther umkristallisiert.

Ausbeute: 18g 89,7% d.Th.  
Fp.: 89°C

$$[\alpha]_D^{20} = + 8,65 \pm 0,2 \quad (c=0,555 \text{ Methanol})$$



MG 400,418

Ber.: C 63,01 H 6,04 N 6,97

Gef.: C 63,18 H 6,09 N 7,06

#### 4.) Carbobenzoxo-glycyl-O-benzyl-L-serin-hydrazid.

6,02g (0,015 Mol) Carbobenzoxo-glycyl-O-benzyl-L-serin-methylester werden in Methanol gelöst, 0,75ml (0,015 Mol) Hydrazin-monohydrat zugegeben und über Nacht stehen gelassen. Das Hydrazid scheidet sich als gallertartige Masse ab.

Der Niederschlag wird abgenutscht und in 150ml heissem Methanol gelöst. Beim Abkühlen scheidet sich das Hydrazid kristallin aus.

Das Produkt wurde noch zweimal aus Methanol umkristallisiert.

Ausbeute: 4,93g 83% d.Th.

Fp.: 120°C

$$[\alpha]_D^{20} = + 2,2 \pm 0,1 \quad (c = 5,65 \text{ Eisessig})$$



MG. 400,424

Ber.: C 59,99 H 6,04 N 13,99

Gef.: C 59,70 H 5,98 N 13,92

#### B.) L-Leucyl-L-tyrosyl-L-glutaminsäure.

##### 1.) Carbobenzoxo-L-leucin. (38)

26,24g (0,2 Mol) L-Leucin wurden in der üblichen Weise mit 30ml Carbobenzoxochlorid umgesetzt. Der farblose Sirup wurde mit Petroläther digeriert und nochmals i.V. eingedampft, um die letzten Reste an Essigester zu entfernen.

Ausbeute: 49,6g 94% d.Th.

##### 2.) O-Benzyl-L-tyrosin. (23)

##### a) O-Benzyl-L-tyrosin-kupferkomplex.

36g (0,2 Mol) L-Tyrosin werden in 150ml Wasser aufgeschlämmt, mit 200ml 2n NaOH gelöst. Dazu fügt man eine Lösung von 24,97g (0,1 Mol)  $CuSO_4 \cdot 5 H_2O$  in Wasser und erwärmt kurze Zeit auf dem Wasserbad. Nach dem Abkühlen setzt man 125ml Methanol zu und filtriert vom Unlöslichen ab. Innerhalb 10 Minuten werden unter Rühren 24,25ml (0,205 Mol) frisch destilliertes Benzylbromid zugetropft. Schon

nach kurzer Zeit tritt eine Abscheidung von feinen Kristallen ein. Man lässt noch 3 Stunden bei Raumtemperatur weiterrühren, wobei die Lösung den pH 8-9 erreicht. Nach weiteren 2 Stunden bei 35°C verringert sich der pH-Wert auf 7. Zur vollständigen Abscheidung lässt man die Lösung einige Stunden im Eisschrank stehen, filtriert den Kupferkomplex ab und wäscht mit Methanol/Wasser nach. Das Produkt wird bei 60°C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.

Ausbeute: 47 g 78,4% d.T. (Lit. 63,0%)

#### b) O-Benzyl-L-tyrosin. (23)

Der feingepulverte Tyrosinkupferkomplex wurde mehrmals mit kalter 1N HCl verrieben, bis das Filtrat farblos geworden ist, abgesaugt, mit Wasser, verdünntem Ammoniak und schliesslich mit Aceton/Äther sorgfältig gewaschen.

Umkristallisation aus 80% Essigsäure führt zu farblosen Kristallplättchen.

Ausbeute: 29,9g 64,3% d.Th. (Lit. 60-65%)  
Fp.: 223°C (Zers.)

#### 3.) O-Benzyl-L-tyrosin-methylester-hydrochlorid. (23)

Das vollkommen trockene O-Benzyl-L-tyrosin wird dreimal mit je 150ml methylalkoholischer 1N HCl über Nacht stehen gelassen und jedesmal bis zur Trockene i.V. eingedampft.

Durch Umkristallisieren aus Methanol/Äther erhält man das Aminosäureester-hydrochlorid in langen verfilzten Nadeln.

Ausbeute: 30,7g 92,8% d.Th. (Lit. 93%)  
Fp.: 183°C (Lit. 181°C)

#### 4.) Carbobenzoxym-L-leucyl-O-benzyl-L-tyrosin-methylester. (23)

25,75g (0,08 Mol) O-Benzyl-L-tyrosin-methylester-hydrochlorid werden in 80ml Pyridin gelöst und unter Eiskühlung und Schütteln tropfenweise eine Lösung von 3,49ml PCl<sub>3</sub> in Pyridin zugefügt. Zu dieser Lösung gibt man 21,23g (0,08 Mol) Carbobenzoxym-L-leucin- in Pyridin gelöst - und erwärmt die Reaktionsmischung drei Stunden auf dem Wasserbad, lässt abkühlen und destilliert das Pyridin i.V. ab. Der Rückstand wird in heissem Essigester aufgenommen, die Lösung mit verdünnter, 5%iger KHCO<sub>3</sub>-Lösung und Wasser gewaschen und schliesslich i.V. eingedampft.

Aus Essigester/Petroläther kristallisiert der Carbobenzoxyster in Form von gebündelten Nadeln.

Ausbeute: 36,2g      85 % d.Th.      (Lit. 87%)  
 Fp.: 109°C      ( Lit.109°)

5.) Carbobenzoxyl-L-leucyl-O-benzyl-L-tyrosin-Hydrazid.

26,6g (0,05 Mol) Carbobenzoxyl-L-leucyl-O-benzyl-L-tyrosinmethylester werden in 120ml Methanol gelöst und mit 3,0ml (0,06 Mol) Hydrazinhydrat versetzt. Die Lösung wurde 20 Min. lang auf dem Wasserbad erwärmt und über Nacht bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Das Carbobenzoxyl-dipeptidhydrat scheidet sich als ein weisser gelatinöser Niederschlag ab.

Nach dreimaligem Umkristallisieren der Substanz aus heissem Methanol resultierte ein kristallines, analysenreines Produkt in Form von langen weissen Nadeln.

Ausbeute: 24,12g      90% d.Th.  
 Fp.: 189°C

$$[\alpha]_D^{20} = + 12,21 \pm 0,2 \quad (c = 2,05 \text{ Eisessig})$$

$C_{30}H_{36}O_5N_4$       MG. 532,620

Ber.: C 67,64    H 6,81    N 10,50

Gef.: C 67,52    H 6,82    N 10,50

6.) L-Glutaminsäure-dibenzylester-hydrochlorid.

a) Darstellung nach Sachs und Brand (35)

Eine Suspension von Log (0,068 Mol) L-Glutaminsäure in 150ml Benzylalkohol wird auf 55°C erwärmt. Anschliessend leitet man eine Stunde lang trockenes HCl-Gas ein. Nach Zusatz von 75ml benzol entfernt man das gebildete Wasser durch azeotrope Destillation i.V. (badtemperat. 40°C), erhöht dann die Badtemperatur auf 85°C und entfernt die grösste Menge Benzylalkohol. Nach Zugabe von 100ml frischem Benzylalkohol wird nochmals eine Stunde HCl eingeleitet,

anschliessend von ungelöstem L-Glutaminsäure-hydrochlorid abfiltriert (ungefähr 2g) und unter Zusatz von Benzol azeotrop destilliert. Diese Prozedur wird noch dreimal wiederholt. Die schliesslich nach weitgehender Entfernung des Benzylalkohols erhaltene warme Lösung wird vorsichtig mit Äther versetzt; dabei scheidet sich das Esterhydrochlorid kristallin ab. Das Rohprodukt wird in Methanol/Äther umkristallisiert.

Ausbeute: 16g 65% d.Th. (Lit. 61%)  
Fp.: 96°C (Lit. 100-102°C korrigiert)

Dieses Produkt erwies sich als chromatographisch nicht einheitlich; es zeigte eine beträchtliche Verunreinigung durch das Monoester-hydrochlorid an. (Sachs und Brand (35) erwähnten in ihrer Publikation keine chromatographische Reinheitsprüfung.)

b) Darstellung nach K. Miller und Waelisch. (36)

35,8g (0,24 Mol) I-Glutaminsäure und 41,13g (0,26 Mol) Benzolsulfosäure werden in 250ml Benzylalkohol unter Erwärmen gelöst. Anschliessend wird das Reaktionsgemisch bei langsam ansteigender Temperatur (sie soll 130°C nicht übersteigen) i.V. der Destillation unterworfen. Mit dem gebildeten Wasser wird so auch der grösste Teil des Alkohols entfernt. Man giesst die noch heisse Lösung in eine grosse Reibschale, lässt etwas abkühlen und fügt vorsichtig 250ml Äther hinzu. Nach gutem Verreiben wird abgenutscht, der Filtrerrückstand mit Äther gewaschen und an der Luft getrocknet.

Das Rohprodukt wird in 250ml Benzylalkohol gelöst und nach Zugabe von 3g Benzolsulfosäure nochmals in der oben angeführten Weise verestert.

Der so gewonnene Ester (100g = 0,206 Mol) wird in 100ml Chloroform gelöst, auf -5°C abgekühlt und innerhalb 10 Min. mit 28,63ml (0,206 Mol) Triäthylamin versetzt. Nun giesst man 700ml absoluten Äther hinzu und filtriert nach 10 Minuten das Triäthylammoniumsulfat ab. In die erhaltene ätherische Lösung des Glutaminsäuredibenzylesters leitet man solange trockenes HCl ein, bis sich kein Esterhydrochlorid mehr abscheidet. Der Ester wird aus Chloroform/Petroläther umkristallisiert.

Ausbeute: 54,57g 62,5% d.Th.  
Fp.: 98°C (Lit. 95-97°C)

7.) Carbobenzoxo-L-leucyl-O-benzyl-L-tyrosyl-L-  
glutaminsäure-dibenzylester.

In einer Mischung von 85ml Eisessig, 20ml Wasser und 5ml 5n HCl werden 5,32g (0,01 Mol) Carbobenzoxo-L-leucyl-O-benzyl-L-tyrosin-hydrazid gelöst, unter 0°C abgekühlt und dann eine vorgekühlte Lösung von 759mg  $\text{NaNO}_2$  in Wasser auf einmal zugegeben. Nach beendeter Reaktion verdünnt man die Lösung mit 2 Volumen Eiswasser, nutsch den gebildeten Niederschlag nach 10 Min. schnell ab und wäscht diesen mit viel Eiswasser nach. Nach dem Abpressen zwischen Filterpapier nimmt man in kaltem Essigester auf, gegebenenfalls unter Zusatz von Chloroform. Die erhaltene Lösung wird rasch mit verdünnter  $\text{KHCO}_3$ -Lösung und Wasser gewaschen und kurz über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet.

Die Azidlösung vereinigt man mit einer Lösung des L-Glutaminsäure-dibenzylesters in Chloroform (erhalten aus 3,6g Esterhydrochlorid + 1,39ml (0,01 Mol) Triäthylamin).

Die Reaktionsmischung wurde 30 Stunden bei 5°C und über Nacht bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Ein Teil des Carbobenzoxo-tripeptidesters kristallisierte während dieser Zeit in langen Nadeln aus. Die Kristalle wurden abfiltriert und mit verdünnter Salzsäure gewaschen. Die organische Phase des Filtrats wurde mit verdünnter HCl,  $\text{KHCO}_3$ -Lösung und Wasser gewaschen, über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und i.V. eingedampft. Der Rückstand wurde mit dem vorher abfiltrierten kristallinen Anteil vereinigt und aus Essigester/Petroläther umkristallisiert.

Ausbeute: 5,2g 70,6% d.Th.

Fp.: 137°C

$$[\alpha]_D^{20} = - 18,1 \pm 0,4 \quad (c = 0,210 \text{ Dioxan})$$

C<sub>49</sub>H<sub>53</sub>O<sub>9</sub>N<sub>3</sub>

MG. 827,938

Ber.: C 71,08 H 6,45 N 5,08

Gef.: C 70,82 H 6,73 N 5,31

8.) L-Leucyl-L-tyrosyl-L-glutaminsäure.

4g Carbobenzoxy-L-leucyl-O-benzyl-L-tyrosyl-L-glutaminsäure-dibenzylester wurden in Dioxan-Wasser (10 : 1) gelöst, 0,5ml Eisessig zugefügt und in Gegenwart von Pd-Schwarz hydriert. (Eventuell ausfallendes Peptid wurde durch Zusatz von heissem Wasser wieder in Lösung gebracht). Nach 10 Stunden wurde der Katalysator gewechselt und weitere 11 Stunden hydriert. Eine chromatographische Überprüfung zeigte nur noch einen ninhydrinpositiven Fleck. Nun wurde vom Katalysator abfiltriert und die Lösung im Vakuum eingedampft. Das erhaltene Rohprodukt wurde in wässrigem Methanol gelöst und durch vorsichtigen Zusatz von Äther zur Kristallisation gebracht.

Ausbeute: 1,5g 72% d.Th.

Fp.: 217°C (Zers.)

C<sub>20</sub>H<sub>29</sub>O<sub>7</sub>N<sub>3</sub>

Mg. 423,456

$$[\alpha]_D^{20} = + 10,1 \pm 0,3 \quad (c = 0,206 \text{ in } 0,1n \text{ HCl})$$

Ber.: C 56,72 H 6,90 N 9,92

Gef.: C 56,81 H 6,68 N 9,71

C.) Glycyl-L-seryl-L-leucyl-L-tyrosyl-L-glutaminsäure.

1.) Carbobenzoxyl-glycyl-O-benzyl-L-seryl-L-leucyl-L-tyrosyl-L-glutaminsäure.

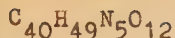
a) 2,003g (0,005 Mol) Carbobenzoxyl-glycyl-O-benzyl-L-serin-hydrazid werden in einer Mischung von 25ml Eisessig und 50ml Wasser gelöst, bis zur beginnenden Erstarrung des Lösungsmittels abgekühlt und mit 2,5ml 25%iger HCl versetzt. Anschliessend gibt man eine vorgekühlte wässrige Lösung von 345,0mg  $\text{NaNO}_2$  zu, wartet einige Minuten und extrahiert das ölige Azid mit kaltem Äther. Die Azidlösung wäscht man mit Eiswasser und 3%iger  $\text{KHCO}_3$ -Lösung säurefrei und trocknet 10 Minuten lang über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ .

In der Zwischenzeit löst man 874mg (0,002 Mol) L-Leucyl-L-tyrosyl-L-glutaminsäure in ca. 30ml Wasser und versetzt mit der äquivalenten Menge = 0,556ml (0,004 Mol) Triäthylamin.

Diese Lösung wird mit der ätherischen des Azids vereinigt und 40 Stunden bei  $5^\circ\text{C}$  geschüttelt. Nun trennt man die beiden Schichten; die wässrige Phase äthert man noch mehrmals aus und stellt sie dann auf kongo-sauer, wobei das Carbobenzoxyl-pentapeptid als weisser Niederschlag ausfällt.

Zur weiteren Reinigung wird dieser Niederschlag in einem Gemisch von Essigester/Chloroform gelöst und darauf mit verdünnter  $\text{KHCO}_3$ -Lösung als Kaliumsalz ausgeschüttelt. Nach Ansäuern des Bikarbonat-Extraktes wird das abgeschiedene Carbobenzoxyl-pentapeptid erneut in viel Essigester übergeführt. Nach Trocknen der abgetrennten organischen Phase mit  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  und Entfernen des Lösungsmittels i.V. erhält man die Verbindung als weisses Pulver vom Schmelzpunkt  $156-159^\circ\text{C}$ .

Ausbeute:            530mg            34% d.Th.



MG. 791,832

Ber.: C 60,60 H 6,24 N 8.87

Gef.: C 59,75 H 6,67 N 9.80

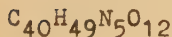
b) Synthese in einer Phase.

0,601 (1,5 Mikromole) Carbobenzoxy-O-benzyl-serin-hydrazid wurden in einer Mischung von 7,5ml Eisessig + 15ml Wasser gelöst, abgekühlt, mit 0,75ml konzentrierter HCl (25% HCl) und schliesslich mit einer wässrigen Lösung von 113,5mg  $\text{NaNO}_2$  versetzt. Nach 5 Min. wird das gebildete Azid mit kaltem Äther ausgeschüttelt, gewaschen, getrocknet und i.V. eingedampft. Das als Rückstand verbliebene Azid wird in vorgekühltem Dioxan gelöst. L-Leucyl-L-tyrosyl-L-glutaminsäure löst man mit 2 Äquivalenten Triäthylamin in wenig Wasser und verdünnt mit der 9-fachen Menge Dioxan.

Beide Lösungen werden nun vereinigt und 30 Stunden bei  $5^\circ\text{C}$  und 10 Stunden bei Raumtemperatur belassen. Die Lösungsmittel werden i.V. entfernt und der Rückstand in viel Essigester aufgenommen. Nach Waschen mit verdünnter HCl und Wasser wird das Carbobenzoxy-peptid mit konzentrierter, kalter  $\text{KHCO}_3$ -Lösung extrahiert. Die weitere Aufarbeitung erfolgte wie in Versuch a). Die Substanz fällt aus Methanol/Äther/Petroläther als körniger Niederschlag.

Ausbeute: 327mg 27,53% d.Th.

Fp.:  $175^\circ\text{C}$  (Zers.)



MG. 791,832

Ber.: C 60,60 H 6,24 N 8,87

Gef.: C 60,46 H 6,20 N 8,89

2.) Glycyl-L-seryl-L-leucyl-L-tyrosyl-L-glutaminsäure.

180mg (0,227 Mikromole) Carbobenzoxy-pentapeptid werden in Dioxan gelöst, einige Tropfen Eisessig zugefügt und in Gegenwart von Pd-Schwarz hydriert. Nach 10 Stunden wurde die Reaktion unterbrochen, vom Katalysator abfiltriert und im Vakuum eingedampft. Das erhaltene Rohprodukt wurde mehrmals mit warmem Wasser digeriert und abgenutscht. Es erwies sich im chromatographischen Test als rein.

Ausbeute: 27mg                      21% d.Th.  
 Fp.: 198°C      (Zers.)

$C_{25}H_{37}N_5O_{10}$                       MG. 567,586      Ber.: N 12,34  
                                                                                                                          Gef.: N 12,45

Eine quantitative Aminosäure-Analyse zeigte folgendes Ergebnis (Einwage 1,165mg = 2,15 Mikromole) :

|                         | Gly  | Ser  | Ieu  | Tyr  | Glu  |
|-------------------------|------|------|------|------|------|
| Gefundene Mikromole:    | 2,20 | 2,09 | 2,07 | 1,61 | 2,15 |
| Gefundenes Verhältn.: : | 1,03 | 0,99 | 0,98 | 0,76 | 1,01 |
| Theor.Verhältnis        | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 1,00 |

D.) Glycyl-O-benzyl-L-seryl-L-leucyl-L-tyrosyl-L-glutaminsäure-dimethylester.

1.) L-Glutaminsäure-dimethylester-hydrochlorid.

14,71g (0,01 Mol) L-Glutaminsäure werden in 300ml Methanol suspendiert und unter Eiskühlung mit trockenem HCl-Gas gesättigt. Unter Zugabe von trockenem Benzol dampft man im Vakuum ein.

Das Öl wurde noch zweimal auf diese Art verestert. Das Rohprodukt konnte durch mehrmaliges Eindampfen mit Äther im Vakuum zum Kristallisieren gebracht werden.

(Nadeln aus Chloroform/Petroläther.)

Ausbeute: 17,2g 81% d.Th.

Eine chromatographische Reinheitsprüfung zeigte eine Verunreinigung durch den Monoester an. Um diesen zu entfernen, wurden die 17,2g in 50ml Chloroform gelöst, auf  $-10^{\circ}\text{C}$  abgekühlt, 11,36ml Triäthylamin zugegeben und mit dem 9-fachen Volumen an trockenem Äther verdünnt. Nach 10 Minuten wird vom ausgeschiedenen Triäthylammonium-hydrochlorid abfiltriert und der Dimethylester durch Sättigen mit HCl-Gas ausgeschieden.

Das Produkt wurde nochmals in Chloroform/Petroläther umkristallisiert.

Ausbeute: 12g = 56% d.Th.

Fp.:  $97^{\circ}\text{C}$

$\text{C}_7\text{H}_{14}\text{O}_4\text{NCl}$  MG. 211,647

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = + 24,9 \pm 0,3 \quad (c = 4,77 \text{ Meth.})$

Ber.: C 39,72 H 6,67 N 6,93 Cl 16,67

Gef.: C 39,57 H 6,85 N 6,73 Cl 16,75

## 2.) Carbobenzoxo-L-leucyl-L-O-benzyl-L-tyrosyl-L-glutaminsäure-dimethylester.

5,32g (0,01 Mol) Carbobenzoxo-L-leucyl-O-benzyl-L-tyrosyl-hydrazid wurden, wie in B 6) bereits beschrieben, in das Azid übergeführt und in Essigester gelöst.

2,12 (0,01 Mol) L-Glutaminsäure-dimethylester-hydrochlorid werden in Chloroform gelöst und unter Eis-Kochsalzkühlung mit 1,42ml Triäthylamin in den freien Ester übergeführt.

Die beiden Lösungen werden nun vereinigt und 40 Stunden bei  $5^{\circ}\text{C}$  stehen gelassen.

Die weitere Aufarbeitung geschieht wie beim Carbobenz-oxy-tripeptid-dibenzylester. (Seite 28.)

Es gelang mir, das Produkt aus Essigester/Petroläther umzukristallisieren.

Ausbeute: 5,2g 76,0% d.Th.

Fp.: 146-48°C

$$[\alpha]_D^{20} = - 27,1 \pm 0,3 \quad (c = 0,387 \text{ Dioxan})$$

$C_{37}H_{45}O_9N_3$  Mg. 675,754

Ber.: C 65,75 H 6,71 N 6,22

Gef.: C 65,45 H 6,62 N 6,38

2,03g ( 3 Mikromole) Carbobenzoxyl-L-leucyl-O-benzyl-L-tyrosyl-L-glutaminsäure-dimethylester gelöst in 50ml absolutem Methanol werden unter Zusatz von 0,5ml Eisessig mit Wasserstoff in Gegenwart von Pd-Schwarz hydriert. Nach 10 Stunden wurde die Hydrierung unterbrochen, die Lösung filtriert und mit frischem Katalysator weitere 6 Stunden hydriert. Nun wurde vom Katalysator abfiltriert und das Lösungsmittel im Vakuum abdestilliert. Als Rückstand verblieb ein Öl, das nach Aufnehmen in heissem Essigester beim Abkühlen kristallisierte. Der Tripeptid-dimethylester erwies sich als chromatographisch rein.

Ausbeute: 1,32g 90,4% d.Th.

Fp.: 153-55°C

$$[\alpha]_D^{20} = - 15,3 \pm 0,3 \quad (c = 0,267 \text{ Methanol})$$

$C_{22}H_{33}O_7N_3$  MG. 451,267

Ber.: C 58,70 H 7,33 N 9,27

Gef.: C 58,13 H 7,18 N 9,27

Da der Carbobenzoxy-tripeptid-dimethylester in Gegenwart von Eisessig abhydriert wurde, war anzunehmen, dass der Ester als Acetat auftreten würde. Die Analysenwerte sprechen eindeutig für den freien Ester. Zur weiteren Identifizierung wurde der Ester in das Hydrochlorid übergeführt.

4.) L-Leucyl-L-tyrosyl-L-glutaminsäure-dimethylester-hydrochlorid.

90,3mg (0,2 Mikromole) werden in absolutem Methanol gelöst und mit einer ätherischen HCl-Lösung versetzt. Das Tripeptid-dimethylester-hydrochlorid beginnt sofort auszufallen. Zur vollständigen Kristallisation stellt man die Lösung für einige Stunden in den Eis-schrank. Das abfiltrierte Produkt wird aus Methanol/Äther umkristallisiert.

Ausbeute: 90mg 92% d.Th.

Fp.:

$$[\alpha]_D^{20} = - 35,2 \pm 0,3 \quad (c = 0,193 \text{ Dioxan})$$

$C_{22}H_{34}O_7N_3Cl$  Mg. 487,723

Ber.: C 54,14 H 7,02 N 8,61 Cl 7,27

Gef.: C 54,02 H 7,05 N 8,42 Cl 7,42

5.) Carbobenzoxy-glycyl-O-benzyl-L-seryl-L-leucyl-L-tyrosyl-L-glutaminsäure-dimethylester.

320,3mg (0,8 Mikromole) Carbobenzoxy-glycyl-O-benzyl-serin-hydrazid werden in 3,75ml Eisessig und 7,5ml Wasser gelöst, abgekühlt, mit 0,37ml konzentrierter HCl und einer wässriger Lösung von 62,1mg (0,9 Mikromole)  $NaNO_2$  versetzt. Nach einigen Minuten extrahiert

man das Azid mit kaltem Äther, wäscht die vereinigten Ätherauszüge mit Eiswasser, mit kalter 5%iger  $\text{KHCO}_3$ -Lösung und nochmal mit Eiswasser, trocknet kurz über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  und zieht den Äther im Vakuum ab.

Das Azid wird nun in kaltem Chloroform gelöst und mit einer Chloroformlösung von 338,6mg (0,7 Mikromole) L-Leucyl-L-tyrosyl-L-glutaminsäure-dimethylester vereinigt. Das Reaktionsgemisch wird 30 Stunden bei  $5^\circ\text{C}$  und 10 Stunden bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Darnach wird die Reaktionslösung mit verdünnter  $\text{HCl}$ , 5%iger  $\text{KHCO}_3$ -Lösung und Wasser gewaschen, mit  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und im Vakuum eingedampft.

Die Substanz konnte aus heissem Methanol umkristallisiert werden.

Ausbeute: 335mg 58,37% d.Th.

Fp.:  $176^\circ\text{C}$

$\text{C}_{42}\text{H}_{53}\text{N}_5\text{O}_{12}$  MG. 819,884

Ber.: C 61,53 H 6,51 N 8,55

Gef.: C 61,79 H 6,31 N 9,07

Eine quantitative Aminosäure-Analyse zeigte folgendes Ergebnis (Einwage 0,982mg = 1,185 Mikromole) :

|                      | Gly   | Ser   | Leu   | Tyr                | Glu   |
|----------------------|-------|-------|-------|--------------------|-------|
| Gefundene Mikromole: | 1,145 | 1,041 | 1,127 | 0,804 <sup>x</sup> | 1,178 |
| Gefundenes Verhält.: | 1,00  | 0,91  | 0,99  | 0,70               | 1,03  |
| Theor.Verhältnis :   | 1,00  | 1,00  | 1,00  | 1,00               | 1,00  |

6.) Glycyl-L-seryl-L-leucyl-L-tyrosyl-L-glutaminsäure-dimethylester.

205mg (0,25 Mikromole) Carbobenzoxycyl-O-benzyl-L-seryl-L-leucyl-L-tyrosyl-L-glutaminsäure-dimethyl-

ester wurden in absolutem Methanol gelöst, dazu einige Tropfen Eisessig zugefügt und in Gegenwart von Pd-Schwarz 10 Stunden lang hydriert, sodann das Lösungsmittel i.V. abgedampft. Das verbleibende Öl erwies sich als chromatographisch unrein.

## ZUSAMMENFASSUNG.

In dieser Arbeit wurde die Synthese des Pentapeptids "Glycyl-L-seryl-L-leucyl-L-tyrosyl-L-glutaminsäure" auf zwei Wegen versucht. Der Aufbau des Pentapeptids erfolgte aus zwei Bruchstücken ( $A + B_1$  bzw.  $B_2$ ). Carbobenzoxy-glycyl-O-benzyl-L-serinazid ( $A$ ) wurde einmal mit L-Leucyl-L-tyrosyl-L-glutaminsäure-dimethylester ( $B_1$ ) und in einem weiteren Versuch mit dem Tri-äthylammoniumsalz des L-Leucyl-L-tyrosyl-L-glutaminsäure umgesetzt ( $B_2$ ). In beiden Fällen konnte eine Ausbeute an Pentapeptidderivat von ca. 30% erhalten werden. Die hydrogenolytische Abspaltung der Schutzgruppen von Carbobenzoxy-glycyl-O-benzyl-L-seryl-L-leucyl-L-tyrosyl-L-glutaminsäure führte zum angestrebten freien Pentapeptid, das nach einer Reinigung als chromatographisch einheitliches Produkt erhalten werden konnte. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten folgende Peptide und Peptidderivate, die in der Literatur noch nicht beschrieben sind, dargestellt werden.

### 1.) Dipeptidderivate.

Carbobenzoxy-glycyl-O-benzyl-L-serin-methylester  
Carbobenzoxy-glycyl-O-benzyl-L-serinhydrazid  
Carbobenzoxy-L-leucyl-O-benzyl-L-tyrosin-hydrazid

### 2.) Tripeptidderivate.

Carbobenzoxy-L-leucyl-O-benzyl-L-tyrosyl-L-glutaminsäure-dibenzylester  
Carbobenzoxy-L-leucyl-O-benzyl-L-tyrosyl-L-glutaminsäure-dimethylester  
L-Leucyl-L-tyrosyl-L-glutaminsäure-dimethylester  
L-Leucyl-L-tyrosyl-L-glutaminsäure-dimethylester-hydrochlorid

3.) Pentapeptidderivate.

Carbobenzoxy-glycyl-O-benzyl-L-seryl-L-leucyl-L-tyrosyl-L-glutaminsäure-dimethylester.

Glycyl-L-seryl-L-leucyl-L-tyrosyl-L-glutaminsäure-dimethylester (ölig).

Carbobenzoxy-glycyl-O-benzyl-L-seryl-L-leucyl-L-tyrosyl-L-glutaminsäure.

4.) Peptide.

L-Leucyl-L-tyrosyl-L-glutaminsäure.

Glycyl-L-seryl-L-leucyl-L-tyrosyl-L-glutaminsäure.

Sämtliche Di- und Tripeptidderivate konnten kristallin erhalten werden. Von den Pentapeptidderivaten gelang es den Carbobenzoxy-glycyl-O-benzyl-L-seryl-L-leucyl-L-tyrosyl-L-glutaminsäure-dimethylester zu kristallisieren. Von den beiden freien Peptiden ließ sich L-Leucyl-L-tyrosyl-L-glutaminsäure zur Kristallisation bringen.

LITERATUR-VERZEICHNIS.

- 1.) V.du Vigneaud, Ch.Ressler, J.M.Swan,  
C.W.Roberts und P.G.Katsoyannis,  
J.Am.Chem.Soc. 76 (1954) 3115
- 2.) R.A.Boissonas, St.Guttman, P.-A.Jaquenod  
und J.P.Waller,  
Helv.Chim.Acta 38 (1955) 1491
- 3.) J.Rudinger, J.Honzl und M.Zaoral,  
Coll.Czech.Chem.Comm. 21 (1956) 202
- 4.) L.Velluz, G.Amiard, J.Bartos, B.Goffinet  
und R.Heymes,  
Bull.Soc.Chim.France 1956, 1464
- 5.) P.G.Katsoyannis, P.T.Gish und du Vigneaud,  
J.Am.Chem.Soc. 79 (1957) 4516  
V.du Vigneaud und Mitarbeiter,  
J.Am.Chem.Soc. 78 (1956) 1905,  
V.du Vigneaud, M.F.Bartlett und A.Jöhl,  
J.Am.Chem.Soc. 79 (1957) 5572
- 6.) J.Rudinger und Mitarbeiter,  
Coll.Czech.Chem.Comm. 21 (1956)
- 7.) R.A.Boissonas und Mitarbeiter,  
Helv.Chim.Acta 39 (1956) 1421
- 8.) P.G.Katsoyannis,  
J.Am.Chem.Soc. 79 (1956) 109
- 9.) R.Schwyzer und Mitarbeiter,  
Chimia 10 (1956) 265
- 10.) R.Schwyzer und Mitarbeiter  
Angew.Chem. 69 (1957) 179  
Helv.Chim.Acta 40 (1957) 614  
Chimia 11 (1957) 335  
Experientia 13 (1957) 361
- 11.) F.M.Bumpus, H.Schwarz und J.H.Page,  
Science 125 (1957) 886
- 12.) B.Jselin, W.Rittel, P.Sieber und R.Schwyzer,  
Helv.Chim.Acta 40 (1957) 373
- 13.) P.H.Bell und Mitarbeiter  
J.Am.Chem.Soc. 76 (1954) 5565  
77 (1955) 3419  
78 (1956) 5051
- 14.) W.W.Bromer, L.G.Sinn, A.Staub und O.K.Behrens,  
J.Am.Chem.Soc. 78 (1956) 3856  
W.W.Bromer und Mitarbeiter,  
J.Am.Chem.Soc. 79 (1957) 2794, 2798, 2801, 2805, 2807

- 15.) F.Sanger und H.Tuppy,  
 Biochem.J.49 (1951) 463, 481  
 F.Sanger und E.O.Thompson,  
 ibid.53 (1953) 353, 366  
 F.Sanger,  
 ibid.44 (1949) 126
- 16.) R.A.Boissonnas, St.Guttman, J.P.Waller  
 und P.H.Jaquenod  
 Experientia 12 (1956) 446
- 17.) K.Hofmann und Mitarbeiter,  
 J.Am.Chem.Soc.79 (1957) 1641  
79 (1957) 1636  
77 (1955) 2914  
79 (1957) 6087
- 18.) R.B.Merrifield und D.W.Wooley,  
 J.Am.Chem.Soc.78 (1958) 4646
- 19.) R.Strobel, Dissertation  
 Universität München (1958)
- 20.) E.Granzer, Dissertation,  
 Universität München (1959)
- 21.) K.Hannig, M.Schleyer  
 unveröffentlichte Mitteilung
- 22.) J.L.Wood und du Vigneaud  
 J.Biol.Chem.134, 413 (1940)  
 W.Graßmann, E.Wünsch, F.Deufel und A.Zwick  
 Chem.Ber.91, 538 (1958)  
 G.Fürst, Dissertation,  
 Universität München (1957)
- 23.) Goldschmidt, St. und H.Lautenschlager,  
 Ann.580, 68 (1953)  
 E.Wünsch, G.Fries und A.Zwick,  
 Chem.Ber.91, Jahrgang 542 (1958)
- 24.) Goldschmidt, St.  
 Angew.Chem.62, 538 (1958)  
 Goldschmidt, St. und H.Lautenschlager,  
 Ann. 580, 68 (1953)
- 25.) W.Graßmann und E.Wünsch,  
 Chem.Ber., 91 (1958) 449  
 A.Zwick,  
 Diplomarbeit, Universität München (1956)  
 G.Fries,  
 Diplomarbeit, Universität München (1956)  
 E.Wünsch, Dissertation,  
 Universität München (1956)
- 26.) E. Wünsch, G.Fries und A.Zwick,  
 Chem.Ber., 91. Jahrgang (1958) 542
- 27.) W.Graßmann, E.Wünsch, F.Riedel,  
 Chem.Ber.91, 455 (1958)

- 28.) J.G.Sheehan und G.P.Hess,  
J.Am.Chem.Soc.77, 1067 (1955)
- 29.) Th. Curtius und Wüstenfeld,  
R.J.prakt.Chemie 70, 73 (1904)
- 30.) M.Bergmann, L.Zervas und J.S.Fruton,  
Ber.dtsch.chem.Ges.62, 1901 (1929)  
B.Hegedüs,  
Helv.Chim.Acta 31, 737 (1948)  
Le Quesne, W.J. und G.T.Young,  
J.Chem.Soc.(London) (1950), 1954
- 31.) J.S.Fruton,  
J.Biol.Chem.146, 463 (1942)  
E.L.Smith und M.Bergmann,  
J.Biol.Chem.153, 627 (1944)
- 32.) W.Graßmann und E.Wünsch  
Fortsch.Chem.org.Naturstoffe (Wien) 13 (1956) 444
- 33.) Th.Curtius und E.Lambotte,  
J.prakt.Chem.70, 109 (1904)  
Th.Curtius und L.Levy,  
J.prakt.Chem.70, 89 (1904)
- 34.) M.Bergmann und L.Zervas,  
Berichte 65, 1192 (1932)
- 35.) H.Sachs und E.Brand,  
J.Am.Chem.Soc.75, 4610 (1953)
- 36.) V.Miller und Waelsch,  
J.Am.Chem.Soc. 74 1092 (1953)
- 37.) J.L.Wood und V.du Vigneaud  
J.Biol.Chem.134, 413 (1940)
- 38.) Vaughan jr. J.R. und Eichler J.A.,  
Am.Soc.76, 2474 (1954)

## Lebenslauf.

Am 25. Oktober 1926 wurde ich als 2. Kind der Eheleute Johann und Margaretha Fischer, geb. Felser, in München geboren.

Nach dem Besuch der Volksschule in Neuburg a./D. und in Amberg (Obpf.) bestand ich im Sommer 1937 die Aufnahmeprüfung an der Oberschule für Jungen in Amberg.

Im Juni 1943 wurde ich zur Flak einberufen und im Frühjahr 1944 von der Wehrmacht übernommen. Nach zehnmonatiger Gefangenschaft wurde ich im Oktober 1945 nach meinem Heimatort entlassen. Nach dieser Unterbrechung kehrte ich zur Schule zurück, legte im Sommer 1947 die Reifeprüfung ab und begann mit dem Wintersemester das Hochschulstudium in Regensburg. Hier legte ich am 12.4.51 die Diplom-Chemiker-Vorprüfung ab. Am 30. Oktober 1953 bestand ich die Diplom-Chemiker-Hauptprüfung an der Universität in München. Im März 1954 begann ich am Max-Planck-Institut für Eiweiß- und Lederforschung mit der Ausführung der Diplomarbeit, die ich im Mai 1956 beendete. Im Frühjahr 1957 begann ich mit der Doktorarbeit am gleichen Institut.





